

白酒酿造废水制备微生物絮凝剂的研究

周明罗¹, 陈 杰¹, 游 玲², 王 涛²

(1.宜宾学院 资源与环境工程学院, 四川 宜宾 644007; 2.宜宾学院 发酵资源与应用四川省高校重点实验室, 四川 宜宾 644007)

摘 要:通过稀释倒平板法从活性污泥中筛选微生物絮凝剂产生菌,并以白酒酿造废水为培养基,在32℃条件下,研究废水化学需氧量(COD)、培养时间、pH值、外加氮、磷营养物等因素对微生物絮凝剂絮凝效果的影响。结果表明,从活性污泥中分离获得了产絮凝菌HN5,经16S rDNA基因序列比对分析鉴定为假中间苍白杆菌(*Ochrobactrum pseudintermedium*),培养产生的微生物絮凝剂有较好的絮凝效果。以白酒酿造废水作为替代培养基培养菌株,适宜的培养条件为:COD 5.0~6.9 g/L,培养时间60~72 h, pH值6~8, KH₂PO₄ 2.0 g/L,所得微生物絮凝剂对高岭土悬浊液最高絮凝率为84.9%。用于处理生活污水时,向每100 mL污水中加入6.0 mL菌株培养液时,絮凝率可达86.8%,悬浮物去除率高达92.5%。利用白酒酿造废水作为微生物絮凝剂廉价培养基是可行的,既降低培养成本又能实现废液利用。

关键词:微生物絮凝剂;白酒酿造废水;絮凝率

中图分类号:X797

文章编号:0254-5071(2018)11-0086-05

doi:10.11882/j.issn.0254-5071.2018.11.018

Production of a microbial flocculant using *Baijiu* brewing wastewater

ZHOU Mingluo¹, CHEN Jie¹, YOU Ling², WANG Tao²

(1.College of Resources and Environmental Engineering, Yibin University, Yibin 644007, China;

2.Key Lab of Fermentation Resource and Application of Institutes in Sichuan Higher Education, Yibin University, Yibin 644007, China)

Abstract: The flocculant-producing strain was screened from activated sludge by pour plate method by using *Baijiu* (Chinese liquor) brewing wastewater as a medium. The effect of wastewater chemical oxygen demand (COD), culture time, pH, external nitrogen source, phosphorus source on flocculation effect of microbial flocculant were investigated at 32℃. The results showed that a flocculant-producing strain HN5 was screened, and identified as *Ochrobactrum pseudintermedium* based on 16S rDNA gene sequencing. The suitable culture conditions for microbial flocculants were as follows: wastewater COD 5.0-6.9 g/L, cultivation time 60-72 h, pH 6-8, KH₂PO₄ 2.0 g/L. The microbial flocculants from *Baijiu* brewing wastewater had a good flocculation effect, and the highest flocculating rate to kaolin suspension was 84.9%. When 6.0 ml flocculant was added to 100 ml domestic sewage, the flocculation rate and the suspended solid removal rate were 86.8% and 92.5%, respectively. It was feasible to use *Baijiu* brewing wastewater as a cost-effective medium for microbial flocculants, which could not only reduce the cost of cultivation but also realize the reuse of wastewater.

Key words: microbial flocculant; *Baijiu* brewing wastewater; flocculation rate

微生物絮凝剂是一类具有絮凝活性的微生物代谢产物或分泌物,主要成分为蛋白质、糖蛋白、多糖及脱氧核糖核酸等物质,具有大量的氨基、肽键、羟基、芳环等多种活性官能团^[1-3],这些官能团的电性差异能使水中细小颗粒及胶体物质吸附、凝聚、沉淀,从而有效去除污水中的悬浮物(suspended solids, SS)及胶体物质。微生物絮凝剂对有机物、浊度、色度、金属离子等污染物的去除及污泥脱水均有良好效果^[4-6],具有高效、广谱絮凝、生物可降解、安全无毒、无二次污染等优点,长期以来受到国内外研究者的关注。目前,在絮凝机理、活性成分、絮凝活性微生物来源、应用条件等^[7-10]方面都有大量研究。然而,微生物絮凝剂工业化发展缓慢,实际工程应用仍然较少,生产制备成本高是主要限制因素之一。其中,培养基成本约占微生物

絮凝剂生产总成本70%^[11-12]。因此,探求优良、廉价的培养基,是克服这一瓶颈的有效途径。

众多学者研究了以豆腐废水、啤酒废水、酿醋废水、屠宰废水等作为培养基对产絮凝菌进行培养^[13-15],而以白酒酿造废水作为廉价培养基还鲜有报道。白酒酿造大多以小麦、高粱、玉米等为原辅料,其生产废水主要包括黄水、底锅水等,含有大量蛋白质、糖类、淀粉等含碳、氮有机物^[16],这些含碳、氮物质是微生物生长必需的营养物。本研究从活性污泥中分离产絮凝菌,以白酒酿造废水为廉价培养基,可有效降低白酒废水中的有机物污染物浓度,实现以废治废,同时将白酒废水中含碳、含氮有机物资源化利用以降低微生物絮凝剂的培养成本,为微生物絮凝剂选取廉价培养基提供科学依据。

收稿日期:2018-08-30

修回日期:2018-10-08

基金项目:四川省教育厅项目(13ZB0214);宜宾市科技局项目(2013SF025)

作者简介:周明罗(1977-),男,讲师,硕士,研究方向水处理及资源化。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌种与废水

菌种从宜宾市城市污水处理厂周期循环活性污泥法(cyclic activated sludge system, CASS)生化池的活性污泥中筛选、分离获得。

白酒酿造废水取自宜宾某酒业公司酿造车间黄水及底锅废水,主要污染物浓度为总氮(total nitrogen, TN) 210.5 mg/L、总磷(total phosphorus, TP) 25.6 mg/L、化学需氧量(chemical oxygen demand, COD) 20.8 g/L、五日生化需氧量(biochemical oxygen demand, BOD₅) 10.2 g/L。

1.1.2 试剂及培养基

主要试剂:培养基原料(化学纯)、高岭土、NaOH(分析纯)、盐酸(工业级)等;

富集、分离培养基:牛肉膏5.0 g,蛋白胨10 g,琼脂12 g(富集培养基中不添加),NaCl 4.0 g, pH = 7.0~7.2,加水至1 L, 121 °C灭菌20 min;

发酵培养基:葡萄糖15 g、MgSO₄ 0.3 g、(NH₄)₂SO₄ 0.3 g、酵母膏0.75 g、尿素0.75 g、KH₂PO₄ 3 g、K₂HPO₄ 7.5 g、pH 7.1,加水至1 L, 121 °C灭菌20 min。

1.2 仪器与设备

78HW-1恒温培养箱、BSD-YXF2200恒温摇床:上海博讯实业有限公司;SANYO高压灭菌锅:SANYO公司;DM 2000光学显微镜:德国莱卡公司;Lynx6000离心机:美国thermo公司;PHS-3C pH计:上海雷磁仪器厂;无菌操作台、TU-1901紫外可见光光度计:北京普析通用仪器有限责任公司;Eppendorf AG分子扩增PCR仪:德国Eppendorf公司;Malvern Mastersizer 3000E粒径分析仪:英国Malvern公司等。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种分离与鉴定

菌株分离:取CASS反应池的混合液2 mL,加入98 mL富集培养基中,在35.8 °C、摇床转速120 r/min条件下,培养时间24 h后,取发酵培养液用无菌水稀释1 000倍后,取1 mL接种于分离培养基上,32 °C恒温培养36 h,观察菌落形态,挑取单菌落,继续在分离培养基平板划线纯化3次,得到纯培养菌株,转接到分离培养基斜面上,4 °C保存备用。

絮凝菌株筛选:将分离纯化获得的菌株,接种到发酵培养基,120 r/min、32 °C振荡培养72 h获得发酵液,根据发酵液对高岭土悬浊液的絮凝效果,选出高效的絮凝剂产生菌。

菌株鉴定:根据文献[17]提供的方法,适当修改。提取培养物基因组DNA后,聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增16S rDNA。细菌引物^[18]27f: 5'-AGAGT-TTGATCTGGCTCAG-3'和1541r: 5'-AAGGAGGTGATCC-AGCCGCA-3', PCR反应体系和反应条件参照文献[17]的方法进行,菌株16Sr DNA测序由上海立菲生物技术有限公

司完成,将测序结果提交至美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库,通过Blast与模式菌株比对,将其鉴定到种。

1.3.2 微生物絮凝剂的制备

将优选获得的菌株,在设定条件下培养,获得的发酵培养液即为微生物絮凝剂,采用单因素法,考察白酒废水COD、培养时间、初始pH、外加氮源、磷源等因素对絮凝效果的影响,并优化白酒酿造废水制备微生物絮凝剂的培养条件。

1.3.3 絮凝效果的测定

向100 mL 4 g/L的高岭土悬浊液中加入5 mL微生物絮凝剂(发酵培养液),于200 mL烧杯中快速搅拌1 min,慢速搅拌3 min,静置20 min,取上清液用紫外可见分光光度计在波长550 nm处测吸光度值,每次3个平行样,并按式(1)计算絮凝率(η)。

$$\eta = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_0 为原悬浊液吸光度值; A 为絮凝后悬浊液吸光度值。

1.3.4 水质及絮体粒径测定方法

COD的测定采用HJ/T 399—2007《水质 化学需氧量的测定 快速消解分光光度法》;BOD₅的测定采用HJ 505—2009《水质 五日生化需氧量的测定 稀释与接种法》;NH₃-N的测定采用HJ 535—2009《水质 氨氮的测定 纳氏试剂分光光度法》;总氮的测定:采用HJ 636—2012《水质 总氮的测定》中的过硫酸钾消解法;总磷的测定:采用HJ 671—2013《水质 总磷的测定》中的钼酸铵法。

污水中絮体粒径用Malvern Mastersizer 3000E粒径分析仪测定, D_{10} 表示絮体颗粒的累积含量为10%时对应的絮体粒径,其值越小反映细微颗粒越多; D_{90} 表示絮体颗粒的累积含量为90%时对应的絮体粒径,其值越大反映大颗粒越多。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选与鉴定结果

2.1.1 菌株的筛选

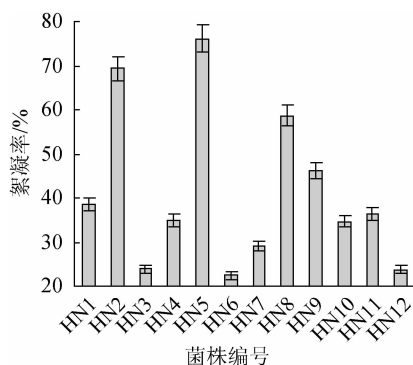


图1 不同菌株的絮凝效果

Fig. 1 Flocculation effect of different strains

共筛选到12株产絮菌，依次编号为HN1~HN12。在发酵培养基中在温度32 ℃、转速120 r/min条件下，培养48 h，并对发酵液的絮凝效果进行测定，结果见图1。分析絮凝率可知，产絮菌HN2、HN5培养发酵液絮凝效果较好，絮凝率分别为69.3%、76.1%。为此，选择絮凝率最高的产絮菌HN5为实验菌株。

2.1.2 菌株鉴定

絮凝效果最好的产絮菌HN5颜色呈乳白色、边缘整洁、表面湿润、微凸、单菌落直径2 mm左右，革兰氏阴性；其16S rDNA序列比对结果见表1。由表1可知，菌株HN5 16S rDNA序列与 *Ochrobactrum pseudintermedium* ADV31 (Genbank no. NR043756.1) 的相似度最高，为99%，与其余种属的相似性均低于97%。故将HN5菌株初步鉴定为假中间苍白杆菌 (*Ochrobactrum pseudintermedium*)。该种属细菌广泛分布于活性污泥环境，如王丽^[9]从活性污泥中分离获得苍白杆菌 (*Ochrobactrum* sp.)、苏峰等^[20]从生活污水站曝气池活性污泥中分离获得 *Ochrobactrum* sp. Azn6.1产絮菌。

表1 菌株HN5的16S rDNA系列比对结果

Table 1 Alignment results of 16S rDNA sequence of strain HN5

模式菌株	PCR产物 长度/bp	相似度/ %	模式菌株 登录号
<i>Ochrobactrum pseudintermedium</i> strain ADV31	1 393	99	NR-043756.1
<i>Phyllobacterium Leguminum</i> strain ORS 1419	1 288	97	NR-042396.1
<i>Phyllobacterium Leguminum</i> strain ORS 1419	1 288	97	NR-115324.1
<i>Ochrobactrum oryzae</i> strain NBRC 102588	1 254	97	NR-114151.1
<i>Ochrobactrum oryzae</i> strain MTCC 4195	1 254	97	NR-042417.1
<i>Ochrobactrum intermedium</i> strain NBRC 15820	1 249	97	NR-113812.1
<i>Ochrobactrum grignonense</i> strain NBRC 102586	1 227	96	NR-114149.1
<i>Ochrobactrum grignonense</i> strain OgA9a	1 227	96	NR-028901.1

2.2 白酒废水制备微生物絮凝剂的条件

2.2.1 废水COD对絮凝效果的影响

将白酒废水 (COD 20.8 g/L) 分别稀释2、3、4、5、6、8倍作为发酵培养基，以菌株HN5预发酵液按2%接种量接入，在32 ℃、转速120 r/min条件下，恒温培养60 h，考察不同COD浓度对絮凝效果的影响，结果如图2所示。当白酒废水COD为4.2~6.9 g/L时，絮凝率在70.4%以上，其中效果最好为78.4%，此时稀释倍数为4，COD为5.2 g/L。COD浓度太高时有机碳源负荷过高或COD浓度过低时碳源等营养物质不够，都不利于微生物生长并抑制多糖类物质的分泌，而多糖物质是微生物絮凝剂的主要成分^[4,21]。

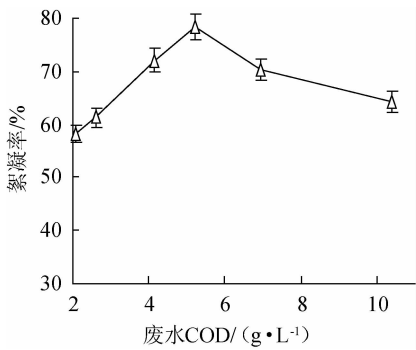


图2 不同COD对絮凝效果的影响
Fig. 2 Effect of different COD on flocculation

2.2.2 培养时间对絮凝效果的影响

在白酒废水COD 5.2 g/L、32 ℃、120 r/min培养条件下，考察不同培养时间对絮凝效果的影响，结果如图3所示。随着培养时间增加，絮凝率先增大后减小，培养时间在60 h、72 h、84 h时絮凝率分别为78.8%、80.1%、74.2%，在72 h时絮凝率最高，随着培养时间的增大，发酵液中营养物质逐渐消耗，菌体细胞的代谢方向发生变化，粘性有机大分子代谢产物减少，使得微生物絮凝剂活性减弱。因此，发酵培养时间在60~72 h为宜。

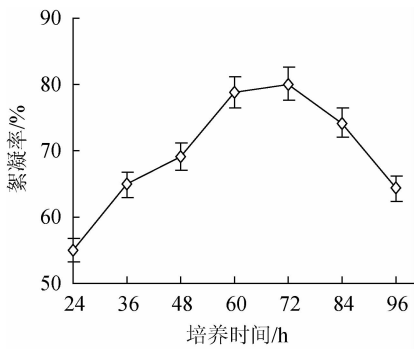


图3 不同时间对絮凝效果的影响
Fig. 3 Effect of different time on flocculation

2.2.3 培养pH对絮凝效果的影响

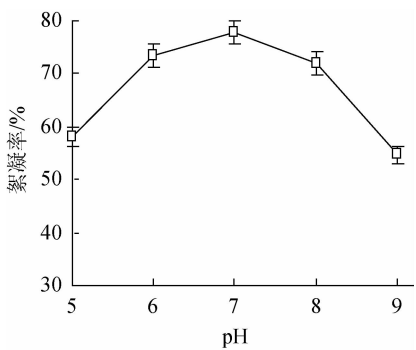


图4 不同pH对絮凝效果的影响
Fig. 4 Effect of different pH on flocculation

在白酒废水COD 5.2 g/L、32 ℃、120 r/min条件下,培养60 h后,用HCl和NaOH溶液,调节培养基初始pH值,考察不同pH对絮凝效果的影响,结果如图4所示。结果表明,废水pH值为6、7、8时絮凝效果较好,絮凝率达到72.1%以上,即在弱酸性、中性、弱碱性条件下的絮凝效果较好。原因是培养液pH值会影响氧化还原电位的大小以及有机物的离子化作用,从而影响微生物对营养物质的吸收利用和絮凝物质的分泌;同时生物酶只能在一定pH值下才能发挥高活性,pH值过高或过低都将降低酶的活性。

2.2.4 外加营养物质对絮凝效果的影响

白酒废水COD 5.2 g/L, pH调整为 7.0 ± 0.1 , 在32 ℃、120 r/min条件下,添加不同量的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KH_2PO_4 , 培养60 h, 考察不同外加氮、磷量对絮凝效果的影响, 结果如图5所示。由图5可知, 随着 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 量的增大, 絮凝效果变化甚微, 说明白酒废水中有足够氮源供微生物所需, 不需要外加氮源; 随着 KH_2PO_4 的添加量增大, 絮凝率逐渐变大, 当添加量增大到2.0 g/L以后, 继续增大投加量, 絮凝率增大不明显, KH_2PO_4 的适宜添加量为2.0 g/L。

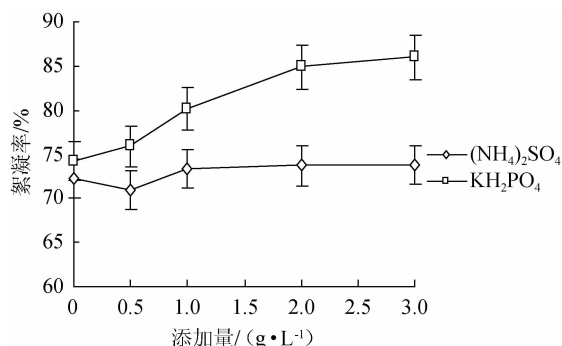


图5 外加物质对絮凝效果的影响

Fig. 5 Effect of additional nutrient on flocculation

2.3 对生活污水的处理效果

在白酒废水COD 5.2 g/L、 KH_2PO_4 2.0 g/L、培养基初始pH值 7.0 ± 0.1 、32 ℃、120 r/min条件下,培养60 h后,向100 mL生活污水中加入不同体积发酵培养液,其絮凝效果及对COD、悬浮物(SS)、氨氮($\text{NH}_3\text{-N}$)去除率结果如图6所示,絮凝率最高时污水中絮体粒径如图7所示。

由图6可知,HN5产絮菌发酵培养液对生活污水絮凝和SS去除有很好的效果,并且随着发酵液投加量的增加,其去除率先增大后减少,絮凝剂投加量为6 mL/100 mL时,絮凝效果最高为86.8%、SS去除率高达92.5%。COD的去除率低于SS的去除率;随着发酵液投加量的增加, $\text{NH}_3\text{-N}$ 去除率未出现规律性增加,且去除率均低于20%。这是因为生活污水中有大量溶解性COD,以及污水中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 为溶解性的,而絮凝对溶解性物质没有显著去除效果。SS的高去除率和高絮凝效果,说明微生物絮凝剂对胶体、悬浮物形成

絮体起到了正效应,能有效加强悬浮物、胶体物及微生物絮凝剂之间的相互作用,促进架桥联接和大颗粒絮体形成进而增强絮凝效果;但随着絮凝剂投加量的进一步增加,会在水中形成反电位而使絮凝效果下降^[7,22]。由图7可知,加入了微生物絮凝剂的污水 D_{10} 较小,说明细微颗粒所占的比例高于空白污水;投加絮凝剂后,污水 D_{90} 对应的粒径开始时大于未投加絮凝剂的污水,沉降一定时间后,小于空白污水,说明加入絮凝剂后,促进了絮体的形成,且生活污水中形成的絮体颗粒易于沉降,进而表明菌株HN5产生的絮凝剂适宜于生活污水的絮凝处理,能有效去除悬浮物。

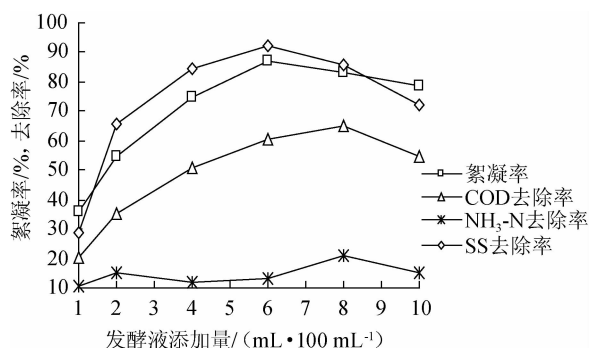


图6 菌株发酵培养液对生活污水处理的效果

Fig. 6 Effect of fermentation medium on domestic sewage treatment

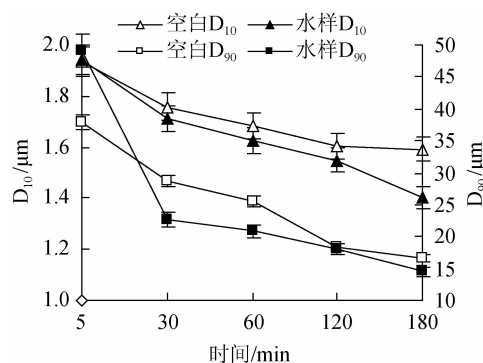


图7 生活污水中絮体粒径

Fig. 7 Flocs size in domestic sewage

3 结论

从活性污泥中分离获得的产絮菌HN5,经鉴定为假中间苍白杆菌(*Ochrobactrum pseudintermedium*),培养产生的发酵液具有较好的絮凝效果,对高岭土悬浊液絮凝率最高可达84.9%。

利用白酒酿造废水作为替代培养基,产絮菌HN5发酵液仍具有较高的絮凝率,影响其絮凝效果的主要因素包括白酒酿造废水COD、培养时间、培养基pH值、外加磷源;适宜的培养条件为COD 5.0~6.9 g/L,培养时间60~72 h, pH值6~8, KH_2PO_4 2.0 g/L。

用产絮菌HN5发酵液处理生活污水,当絮凝剂投加量

为6.0 mL/100 mL时,效果最好,絮凝率达到86.8%、SS去除率高达92.5%。白酒酿造废水用于产絮凝菌的培养,微生物絮凝剂具有较高的絮凝效果。

参考文献:

- [1] 陈俊,詹志钢,陈哲,等.一株絮凝菌的鉴定、絮凝基因定位及其絮凝剂成分分析[J].生物技术通报,2012,28(4):122-126.
- [2] PENG L, YANG C, ZENG G, et al. Characterization and application of bioflocculant prepared by *Rhodococcus erythropolis* using sludge and livestock wastewater as cheap culture media[J]. **Appl Microbiol Biot**, 2014, 98(8): 6847-6858.
- [3] 李明源,王继莲,魏云林,等.细菌胞外多糖的特性及应用研究[J].生物技术通报,2014,30(6):51-56.
- [4] 周英勃,柴涛,段婉君.白醋废水制备微生物絮凝剂的响应面法优化及其对造纸废水的处理[J].环境工程学报,2016,10(10):5698-5664.
- [5] 张峰,彭辉,杨思敏,等.微生物絮凝剂与Fenton试剂联合调理对印染污泥脱水性能的影响[J].环境工程学报,2016,10(6):2962-2968.
- [6] PAN X H, CHENG Y J, PAN D M, et al. Application of bacteria in remediation of Cr(VI) and Ni(II) containing electroplating wastewater by cheap cultivation[J]. **J Agr Biotechnol**, 2014, 22(6): 779-786.
- [7] 郑怀礼.生物絮凝剂与絮凝技术[M].北京:化学工业出版社,2003:17-22.
- [8] PROMBUTARA P, ALLEN M S. Flocculation-related gene identification by whole-genome sequencing of *Thauera aminoaromatica* MZ1T floc-defective mutants[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2015, 82(6): 1646-1652.
- [9] 张媛媛,杨朝晖,曾光明,等.微生物絮凝剂MBFGA1的结构鉴定及絮凝机理研究[J].中国环境科学,2013,33(2):278-285.
- [10] SALEHIZADEH H, VOSSOUGH M, ALEMZADEH I. Some investigations on bioflocculant producing bacteria[J]. **Biochem Eng J**, 2000, 5(1): 39-44.
- [11] 雷志斌,胡勇有,于琪.复合生物絮凝剂CBF-1的制备及其絮凝特性[J].环境科学学报,2012,32(12):2905-2911.
- [12] NDIKUBWIMANA T, ZENG X H, MURWANASHYAKA T, et al. Harvesting of freshwater microalgae with microbial bioflocculant: a pilot-scale study[J]. **Biotechnol Biofuel**, 2016, 9(1): 47.
- [13] 王钰舟,杨雷,张景来,等.利用啤酒废水培养极大螺旋藻[J].化工环保,2014,34(3):257-261.
- [14] 房亚玲,柴涛,郭嘉吻.酿醋废水廉价制备降解煤化工废水微生物絮凝剂[J].中北大学学报:自然科学版,2016,37(2):157-161.
- [15] 郭俊元,周心甜.屠宰废水制备微生物絮凝剂及改善污泥脱水性能的研究[J].中国环境科学,2017,37(7):2615-2622.
- [16] 彭翠珍,宗绪岩,张宿义,等.酿酒废水处理存在的问题及解决措施[J].中国酿造,2017,36(5):1-4.
- [17] RAINEY F A, NAOMI W R, KROPPESTEDT R M, et al. The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of Nocardiosaceae fam. nov[J]. **Int J Syst Bacteriol**, 1996, 46: 1088-1092.
- [18] BROSIUS J, DULL T J, SLEETER D D, et al. Gene organization and primary structure of a ribosomal DNA operon from *Escherichia coli*[J]. **J Mol Biol**, 1981, 148: 107-127.
- [19] 王丽.产絮菌 *Ochrobactrum* sp. W2 利用玉米秸秆水解液的产絮特性及机制研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2014.
- [20] 苏峰,赵祥颖,张家祥,等.微生物絮凝剂产生菌的筛选及鉴定[J].中国酿造,2011,30(3):94-96.
- [21] 姚颖吉.复合微生物絮凝剂的制备及其对水中重金属的去除研究[D].昆明:昆明理工大学,2017.
- [22] 刘立凡,成文,胡勇有.微生物絮凝剂的化学组成及絮凝特性研究[J].环境科学与技术,2008,31(7):7-10.